

全血/组织/细胞/细菌基因组DNA快速提取试剂盒

货号：DD105

保存：15-25 °C

【产品概述】

本产品独特的结合液/蛋白酶K迅速裂解细胞和灭活细胞内核酸酶，基因组DNA在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，抑制物去除液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，在低盐洗脱缓冲液作用下得到纯净的基因组DNA。

【产品组分】

货号	组分	DD105-01 (50T)	DD105-02 (100T)
DD105-101	平衡液	5 ml	10 ml
DD105-102	裂解液TL	11 ml	20 ml
DD105-103	结合液CB	15 ml	30 ml
DD105-104	抑制物去除液IR	25 ml	50 ml
DD105-105	漂洗液WB (首次使用前按说明加指定量无水乙醇)	13 ml	25 ml
DD105-106	洗脱缓冲液EB	15 ml	15 ml
DD105-107	蛋白酶K溶液 20mg/ml	1 ml	1 ml x 2
DD105-108	吸附柱AC&收集管 (2ml)	50套	100套

【保存条件】

室温 (15-25°C) 保存，保质期一年。

- (1) 裂解液TL、结合液CB、抑制物去除液IR低温时可能出现析出和沉淀，在37°C水浴几分钟溶解，澄清透明后冷却到室温即可使用。
- (2) 蛋白酶K保存在即用型甘油缓冲液中，常温运输，收到后，不超过25°C室温至少保存6个月，4°C保存12个月，-20°C保存2年。

【产品特点】

1. 本产品不需要使用苯酚，不需要乙醇沉淀。
2. 快速，简捷，单个样品操作30分钟内完成。
3. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀比值达1.7~1.9，长度可达30kb -50kb，可直接用于PCR，Southern-blot和各种酶切反应。
4. 200µl 常规全血可提取出3-6 µg基因组DNA。

【实验准备】

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到13,000rpm的台式离心机。
2. 需要自备乙醇，异丙醇，1× PBS (磷酸盐缓冲液，可选)，RNase A (可选) 溶菌酶 (用于革兰氏阳性菌，可选)。
3. 实验前将水浴先预热到70°C备用。
4. 为了最佳效果，建议使用新鲜血液标本或者4°C存放少于3天的标本，使用反复冻融超过3次的标本，可能会降低产量。
5. 平衡液的使用：吸附柱放置过程中会同空气中的电荷等发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可以提高核酸的结合能力。从而提高回收效率或产量。平衡液是强碱性溶液，若不小心碰到，请用大量自来水清洗。用完后拧紧瓶盖，以免接触空气。(柱子用前才预处理) 取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取100 µl的平衡液至柱子中。13000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

【操作步骤】

提示：（1）首次使用前请在漂洗液WB中加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时标注，以免重复。

（2）平衡液预处理吸附柱备用：此步骤非常重要，方法见实验准备第5条。

1. 全血

a. 取200 μ l新鲜、冷冻或加入抗凝剂的血液，放入1.5ml离心管。

如果全血起始量小于200 μ l，则用1 \times PBS补足到200 μ l。如果起始量介于200 μ l-300 μ l之间，则后续操作需要按照比例增加试剂用量。如果起始量介于300 μ l-1ml之间，则需要先进行红细胞裂解操作（见本说明书后附录）。

如果处理血样为禽类、鸟类、两栖类或更低等生物的抗凝血液，其红细胞为有核细胞，因此处理量5-20 μ l，可加1 \times PBS补足到200 μ l后进行后续步骤。

b. 加入20 μ l蛋白酶K溶液，充分混匀，再加入200 μ l结合液CB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，在70 $^{\circ}$ C放置10分钟。溶液应变清亮（但颜色偏黑色）。

选做步骤：如RNA残留较多需去除，可在加入200 μ l结合液CB前加5 μ l RNase A (100mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置5-10分钟。

c. 冷却后加100 μ l异丙醇，（也可以用无水乙醇替代，以下同），**立刻涡旋振荡充分混匀**，此时可能会出现絮状沉淀。

上述步骤中立刻涡旋或者吹打充分混匀非常重要，混匀不充分会降低产量，如样品粘稠不易混匀时可以涡旋振荡15秒混匀。

d. 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱AC中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm离心60秒，倒掉收集管中的废液。

e. 接操作步骤第6步。

2. 组织培养细胞

a. 收集约 10^5 - 10^6 悬浮细胞到一个1.5ml离心管；对于贴壁细胞，应该先用胰蛋白酶消化后吹打下来收集。

b. 13,000rpm离心10秒，使细胞沉淀下来。弃上清，留下细胞团。

c. 加200 μ l 1XPBS重悬洗涤细胞，13,000rpm离心10秒，使细胞沉淀下来。完全吸弃上清，将细胞沉淀重悬于180 μ l 1XPBS中。

d. 加入20 μ l蛋白酶K溶液，充分混匀，再加入200 μ l结合液CB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，在70 $^{\circ}$ C放置10分钟。

选做步骤：如RNA残留较多需去除，可在加入200 μ l结合液CB前加5 μ l RNase A (100mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置5-10分钟。

e. 冷却后加100 μ l异丙醇，**立刻涡旋振荡充分混匀**，此时可能会出现絮状沉淀。

f. 将上一步混合物（包括可能有的沉淀）加入吸附柱AC中，（吸附柱放入收集管中）13,000rpm离心60秒，倒掉收集管中的废液。

g. 接操作步骤第6步。

3. 动植物组织（例如鼠肝脑或者植物叶片）

a. 将20 - 50 mg新鲜或者解冻的组织用解剖刀切成小碎块（切成小块可以提高产量）或者在液氮中研磨组织成细粉，转入装有180 μ l组织裂解液 TL的1.5 ml离心管中，用大口径枪头吹打混匀。

b. 加入20 μ l蛋白酶K，**立刻涡旋振荡充分混匀**。

c. 将裂解物放置在55 $^{\circ}$ C水浴1-3小时或者直到组织消化完全，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。

选做步骤：如RNA残留较多需去除，可在完成步骤c后加5 μ l RNase A (100 mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置5 - 10 min。

d. 加入200 μ l结合液CB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，70 $^{\circ}$ C放置10 min。

e. 冷却后加100 μ l异丙醇，**立刻涡旋振荡充分混匀**，此时可能会出现絮状沉淀。

f. 将上一步混合物（包括可能有的沉淀）加入一个吸附柱AC中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm离心1 min，倒掉收集管中的废液。

如果有不溶组织堵住枪头，可将枪头在吸水纸上轻蹭去除；去除不溶物是为了免堵塞离心柱。

g. 接操作步骤第6步。

4. 动物组织（鼠尾）

a. 将0.2–0.5cm的鼠尾尖（即20–50mg）剪碎（一定要剪0–2cm范围内的尾尖，否则裂解效果不好），或者在液氮中研磨组织成细粉后，转入装有180 μ l组织裂解液TL的1.5ml离心管中，用大口径枪头吹打混匀。

b. 加入20 μ l的蛋白酶K (20mg/ml)，立刻涡旋振荡充分混匀。

c. 将裂解物放置在55°C水浴3小时或者直到组织消化完全，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。

选做步骤：如RNA残留较多需去除，可在完成步骤c后加5 μ l RNase A (100 mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置5–10 min。

d. 可选做：用剪大口径的吸头抽打裂解物2–3次帮助裂解。

e. 加入200 μ l 结合液CB和100 μ l 异丙醇，立刻涡旋振荡充分混匀。

f. 13,000rpm 离心5分钟，将上清加入吸附柱AC中，（吸附柱放入收集管中）13,000rpm离心30–60秒，倒掉收集管中的废液。

g. 接操作步骤第6步。

上述步骤中立刻涡旋或者吹打充分混匀非常重要，混匀不充分会降低产量，如样品粘稠不易混匀时可以涡旋振荡15秒混匀。

5. 细菌

a. 取0.5–2 ml培养菌液（最多不超过 2×10^9 个细胞），10,000 rpm，离心30 sec，尽可能的吸弃上清，收集菌体。

起始处理量可以根据细菌密度、细胞种类、预期产量进行调整，但是离心吸附柱最大吸附能力是30 μ g基因组DNA，如果菌体过量超过最大吸附能力，反而会降低产量。

b. 加入200 μ l 1 \times PBS重悬，10,000 rpm离心30sec，吸弃上清。将细胞振荡或者吹打充分重悬于180 μ l 1 \times PBS中。

注意：对于较难破壁的革兰氏阳性菌，可略过b步骤，加入溶菌酶进行破壁处理，具体方法为：加入180 μ l缓冲液(20 mM Tris, pH8.0; 2mM Na₂-EDTA; 1.2% Triton X-100; 临用前加入终浓度为20 mg/ml的溶菌酶(溶菌酶必须用溶菌酶干粉溶解在缓冲液中进行配制，否则会导致溶菌酶无活性))，37°C处理30 min以上。

c. 加入20 μ l蛋白酶K溶液，充分混匀，再加入200 μ l结合液CB，立刻涡旋振荡充分混匀，在70°C 放置10 min。

选做步骤：如RNA残留较多需去除，可在加入200 μ l结合液CB前加5 μ l RNase A(100mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置5–10分钟。

d. 冷却后加100 μ l 异丙醇，立刻涡旋振荡充分混匀，此时可能会出现絮状沉淀。

e. 将上一步混合物（包括可能的沉淀）加入一个吸附柱AC中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm离心1 min，倒掉收集管中的废液。

f. 接操作步骤第6步。

6. 加入500 μ l 抑制物去除液IR，13,000 rpm 离心30 sec，弃废液。

7. 加入600 μ l 漂洗液WB（请确定已加入无水乙醇），13,000 rpm 离心30 sec，弃废液。

8. 重复步骤7一遍。

9. 将吸附柱AC放回空收集管中，13,000 rpm 离心2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

10. 取出吸附柱AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加100 μ l 洗脱缓冲液EB（洗脱缓冲液事先在80–100°C水浴中预热可以提高产量），室温放置3–5 min，13,000 rpm 离心1 min。

1) 可将第一次洗脱所得溶液重新加入离心柱中，室温放置2 min，13,000 rpm离心1 min。可以提高浓度10%左右。

2) 洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要DNA浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于50 μ l，体积过小降低DNA洗脱效率，减少DNA产量。

11. DNA可以存放在–20°C，如果要长时间存放，可以放置在–70°C。

12. 附录（以300 μ l, 1ml全血举例红细胞裂解操作）：

1. 吸取900 μ l 红细胞裂解液到一个1.5ml离心管或者3ml红细胞裂解液到一个15ml离心管。（红细胞裂解液可向本公司购买）
2. 将抗凝全血（使用前回复到室温）颠倒混匀后，吸取300 μ l全血和1ml全血分别加到上述1.5ml和15ml离心管中，颠倒6-8次，并倒置轻弹管壁，确保充分混匀。
3. 室温放置10分钟（期间应该颠倒轻弹混匀数次，帮助裂解红细胞）。
4. 12,000 rpm离心20秒（1.5ml离心管），2,000-3,000 rpm离心5分钟（15ml离心管），倒弃红色上清，并小心的尽可能多的吸弃上清（注意不要吸到管底的细胞团），留下完整的管底白细胞团和大约10 μ l的残留上清。

离心后在管底应该见到白色的白细胞团，也可能有一些红细胞残片和白细胞团在一起，但是如果看到的是大部分的红色细胞团，说明红细胞裂解很不充分，应该再加入红细胞裂解液重悬细胞团后重复3，4。

5. 加入200 μ l 1XPBS涡旋振荡重悬白细胞团，充分分散白细胞团。

其中由于肝素抗凝血的白细胞沉淀团很难打散重悬，影响后续实验裂解效果，建议选用非肝素的抗凝剂收集血液标本。

6. 此时可以按照操作提取全血基因组DNA了。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，承诺为您更换等量合格产品，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。